

氏名	田 中 一 巨
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3273 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	高温変換による麻疹ウイルス matrix 蛋白の合成阻害機構の解析
論文審査委員	主 査 教 授 小 倉 壽 副主査 教 授 巽 典之 副主査 教 授 矢 野 郁也

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

麻疹の一症状としてカタル期と発疹期に発熱（39℃～40℃）がみられるが、これはウイルスに感染したマクロファージから産生されるインターロイキン 1 や腫瘍壊死因子（TNF）が発熱中枢を刺激するために起こるとされている。一方、*in vitro* では39℃において麻疹ウイルスの産生量は著減する。従って、麻疹に伴う発熱が麻疹ウイルスの複製および病原性の発現に与える影響を解析することは、麻疹の病態を理解し生ワクチンの改良を進める上で、また麻疹封入体脳炎や亜急性硬化性全脳炎等の合併症の発症機構を考える上で重要と思われる。

麻疹ウイルスの粒子形成に必須の役割を果たすマトリックス（M）蛋白は39℃の高温への変換によりその合成が選択的かつ即座に停止する。これまでの解析によりこの現象は M 蛋白の崩壊、ウイルスゲノム RNA から mRNA への転写障害あるいは mRNA の不安定性によるものでなく、mRNA から蛋白への翻訳段階における阻害により引き起こされていることが明らかにされている。本研究においてこの阻害が M 蛋白の mRNA から蛋白への翻訳のどの段階で起こっているかを解明すること、さらにこの阻害発現に関わる M mRNA の領域を同定することを試みた。

### 【方法】

- (1)ポリソーム解析：麻疹ウイルス感染24時間後、35℃および39℃にてさらに30分間培養した Vero 細胞よりポストミトコンドリア上清を蔗糖密度勾配遠心法により分画した。次に各分画よりRNAを抽出し、ノーザンブロット法にてウイルス mRNA の分布を検索した。
- (2)ウイルス蛋白合成のパルス・チェイス実験：ウイルス感染細胞をパクタマイシンあるいはアニソマイシン存在下にて35℃あるいは39℃で [<sup>35</sup>S]-メチオニンで1分間パルスラベルし、さらに30分間のチェイスを行った。ウイルス蛋白はモノクローナル抗体を用いた放射免疫沈降法と SDS-PAGE 法で検出した。
- (3)欠失変異遺伝子からの M 蛋白の発現：麻疹ウイルス完全長 cDNA をもとに 6 種類の欠失変異遺伝子を作成し、真核細胞発現ベクター pSG5 に挿入した。これらの各プラスミドを HeLa-S3 細胞あるいは BHK 細胞にトランスフェクトし、ワクチニアウイルス-T7-ポリメラーゼシステムを用いて発現させ、各温度における合成を抗 M ポリクローナル抗体による放射免疫沈降法と SDS-PAGE 法にて解析した。

### 【結果】

- (1)ポリソーム解析において、M mRNA のポリソーム分画における分布は、35℃と39℃で変化が無く、高温変換による蛋白合成に変化を生じないヘマグルチニン（H）蛋白の mRNA の分布と同様であった。
- (2)パルス・チェイス実験よりこの阻害は M 蛋白の翻訳の開始ではなくペプチド鎖伸長の段階で停止していることが示唆された。

(3)M蛋白欠失変異遺伝子挿入プラスミドを用いた一時発現実験より、読み取り枠後半部を占める *EcoR* I-*EcoR* I 断片が欠失しかつ3'非コード領域内の *Sma* I部位下流が存在するプラスミドでは39℃におけるM蛋白の合成が35℃の80%以上みられ、有意に回復していた。

#### 【結論】

高温下における麻疹ウイルスM蛋白の合成阻害が、ポリソーム解析とパルス・チェイス実験の結果よりM mRNA から蛋白翻訳へのペプチド鎖伸長の段階で生じていることが明らかにされた。さらに、欠失変異遺伝子の発現実験から読み取り枠後半部の *EcoR* I-*EcoR* I 間がこの合成阻害に関わっていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

麻疹の一症状としてカタル期と発疹期に発熱（39℃～40℃）がみられる。in vitroでは39℃において麻疹ウイルス（measles virus；MV）の産生量は著減し、麻疹ウイルスの粒子形成に必須の役割を果たすマトリックス（matrix；M）蛋白の合成は選択的かつ即座に停止する。本研究はこの阻害がM蛋白のmRNAから蛋白への翻訳のどの段階で起こっているかを解明すること、さらにこの阻害発現に関わるM mRNAの領域を同定することを試みたものである。

ノーザンブロット法を用いたポリソーム解析にてMV感染細胞のM mRNAは35℃と39℃で同様にポリソーム分画に存在していた。これは高温変換により蛋白合成に阻害を生じないヘマグルチニン蛋白のmRNAの分布と同じであった。また、MV感染細胞を蛋白翻訳開始の阻害剤であるパクタマイシンあるいはペプチド鎖伸長の阻害剤であるアニソマイシンの存在下にて35℃あるいは39℃でパルス標識し、ウイルス蛋白合成への影響を検討した。これらの両実験の結果より、高温下においてM蛋白の合成はペプチド鎖伸長の段階で停止していることが明確に示された。

次に、MV完全長M cDNAを真核細胞発現ベクターに挿入し、一時発現実験を行ったところ、上記現象が再現された。さらに、欠失変異を持つM cDNA発現プラスミドを作成し、各温度におけるM蛋白の合成を解析した。その結果、読み取り枠後半部を占める *EcoR* I-*EcoR* I断片が欠失したプラスミドで39℃におけるM蛋白の合成が有意に回復していたことから、この領域が合成阻害に関わっていることが示唆された。

以上、本研究により麻疹ウイルスM蛋白の高温下での合成阻害は、ペプチド鎖伸長の段階で起こり、これには、M mRNAの *EcoR* I-*EcoR* I領域が関与することが示唆された。これらの研究成果は発熱による麻疹ウイルス感染防御機構の一端を分子レベルで明らかにしたものであり、著者は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定した。